柑橘黃龍病(立枯病)之核酸探針與應用

蘇鴻基　洪挺軒　吳孟玲
國立台灣大學植物病蟲害學系

摘　要

柑橘黃龍病的擬病原細菌在寄主體內的濃度低且分布不平均，以往須依賴生物檢定法或電顯切片觀察，相當費時且效果不彰。曾嘗試開發單元抗體做爲病害之診斷探針，但因偵測結果不夠穩定而無法有效應用。爲了研製效果穩定且特異性與敏感度高的病原偵測探針，於是應用現代分子生物學技術，進行病原核酸之選殖，製備出核酸探針以供病害診斷及病原檢疫之應用。從台灣全省各地的柑橘園中，採得各類疑似有黃龍病的柑橘植株，所有疑似有黃龍病的植株皆與核酸探針呈正反應，所有的健康的無毒苗則都没有反應，由此可看出核酸探針Probe 1是一普遍有效的病原探針，對台灣全省各地不同種類的黃龍病病株皆能做有效之偵測。應用黃龍病核酸探針之檢測可以清楚地將假性黃龍病與眞正的黃龍病做確切的分辨。此黃龍病病原核酸探針的點漬雜配法［Dot hybridization（DH）］偵測效果穩定且其特異性與敏感度高，只要0.25克以上的材料即可偵測到病原，已廣泛應用於病原之偵測及生態之研究。爲求建立一套簡便且有效的病原偵測法，就採樣方式、材料處理、核酸抽取等加以研究訂出標準化技術。純化部位比較，在相同病原核酸純化方法下，中肋部分的偵測效果最好；新鮮的材料經風乾處理使之乾燥，與未乾燥處理的同一新鮮材料相互比較其偵測效果及探針敏感度，結果發現經乾燥處理的材料比未乾燥處理者可提高16倍偵測敏感度。在病原檢疫方面，此核酸探針之特異性除了可檢測台灣各柑橘品種中之黃龍病病原外，亞洲地區國家柑橘似黃龍病綠化病病原亦可與此探針雜配反應，但與南非的熱敏感型綠化病菌系統（Heat－sensitive strains）則不反應。顯示此探針是對亞洲的耐熱型黃龍病菌系統具特異性的核酸探針，亦證明所測試之亞洲各黃龍病菌系統均屬耐熱型系統（Heat－tolerant strains）。

關鍵詞：柑橘黃龍病、點漬雜配法，核酸探針。

前　言

柑橘黃龍病是世界上極嚴重的柑橘病害之一，1947年南非地區發現此一病害而首次以"Greening"（綠化病）命名，此病名即一直在世界沿用至今。事實上早在1943年中國大陸即有柑橘黃龍病的報告，此後在世界不同區域陸續有不同病名的發表，在台灣稱爲立枯病。台灣在1951年首次由松本巍教授發現此病害，而以柑橘立枯病命名之，至1958年此病在台灣已相當普遍，因而在經濟上造成重大損失[12]。從1970年以後原本以爲抗病的柚類植株亦開始得病，麻豆地區的文旦柚陸續產生黃龍病的病徵，至此證實黃龍病幾乎可危害台灣各類柑橘品種[11,14]。引起黃龍病的病原是一種特殊的擬細菌（Fastidious bacteria），存於維管束的篩管細胞中，菌體通常爲長桿狀，大小約爲350～550 x 600～1500nm，由兩層外壁膜包圍，厚約20～25nm。此菌體爲多型性，新生的菌體較細長（100～250 x 500～2500nm）而哀老後的菌

體則呈球狀體，直徑約700－800nm，細胞質變得較稀薄。此菌通常以出芽式繁殖，較少以雙裂法或連珠狀增殖[1,2,3,5]。本研究之目的即在開發出黃龍病病原之診斷用核酸探針，一方面藉以正確地鑑定柑橘黃龍病，一方面利用此探針從事以往傳統學術研究上無法解決之問題，以期了解病原感染及傳播之特性，並提供良好的病害診斷方法做爲防治上之參考[7,15,16]。

材料與方法

一、黃龍病病原擬細菌之純化與核酸之抽取：

病原純化之方法乃參考多位學者對植物寄生性病原菌（procaryotes）之研究報告[4,6,8,9,10,13]，經適當修改後而得到。自田間取得柑橘材料割取葉之中肋（midribs）1克以上，以液態氮處理材料使之硬脆，將材料研磨成粉末後，立即混合二至四倍體積的萃取緩衝液（300mM mannitol,5mM $MgCl_2$, 10mM KHP_2O_4 ,50mM Tris－HCl, 5mM EDTA, 4mM mercaptethanol, pH7.4）中再稍做研磨，以低速（4000g）離心10分鐘，所得之上澄液再高速（10000g）離心30分鐘，倒去上澄液而收集沈澱，沈澱之病原體以核酸萃取緩衝液（100mM Tris－HCl, 100m MEDTA, 250mM NaCl, 100ug / ml Proteinase K, pH 8.0）再懸浮之，緩衝液所加入之體積以能完全溶離沈澱爲原則，此爲粗純化之懸浮液。核酸純化方法則參考Current Protocols in Molecular Biology（U.S.A.）書中之2.3節"Preparation of Genomic DNA from Plant Tissue"及2.4節"Preparation of Genomic DNA from Bacteria"。將粗純化之懸浮液經過Sarkosyl / 55℃、CTBA / NaCl / 65℃及等倍體積的phenol / chloroform / isoamyl alcohol（25:24:1）萃取，最後再用酒精將核酸沈澱，以適量的TE buffer溶解之。

二、點漬雜配法（Dot hybridization）

製備好的核酸樣本先溶於含20ug / ml RNase的TE緩衝液中，若需定量時，則先以OD260 值估計其DNA的濃度，再以6X SSC溶液做適當的系列稀釋；通常以4 ug / ul的DNA濃度爲標準之測試濃度，然後再做1 / 2的系列稀釋。每個DNA樣本先煮沸10分鐘並立即冰浴5分鐘，然後各取3ul點在事先已劃好方格的NC或Nylon membrane上；將點好的NC或Nylon membrane以UV crosslinker（Stratagene）照射30秒，使DNA固定於膜上，再放在80℃的烘箱中烘二小時後（可省略），即可進行雜配反應。

將轉載膜（NC或Nylon membrane）放入雜配瓶中，以2X SSC溶液浸潤一下，使膜完全平貼管壁，倒出2X SSC溶液，加入20ml以上的Prehybridization solution【5X SSC; 5X Denhardt's solution（1% Ficoll, 1% PVP, 1% BSA）;25mM Na－phosphate, pH 6.5 ; 0.2 mg / ml denatured salmon sperm DNA】將雜配瓶置入雜配烘箱內且使之轉動，在68℃下反應2－4小時；然後倒出Prehybridization solution，加入10ml以上的Hybridization solution（5%Dextran sulfate;5X SSC;5X Denhardt's solution;20mM Na－phosphate, pH6.5; 0.2 mg / ml denatured salmon sperm DNA），並將1ug以上之已標誌好的核酸探針，經煮沸10分鐘且立即冰浴5分鐘後，亦加至Hybridization solution中，再次轉動雜配瓶，於68℃下反應12－16小時。反應結束後，倒出Hybridization solution，以50ml以上的2X SSC, 0.1%SDS溶液於室溫下洗膜兩次，每次5分鐘；再以0.1X SSC,0.1% SDS溶液於68℃下洗膜兩次，每次15分鐘，清洗時須適度搖動。清洗之後，轉載膜可直接進行呈色反應（呈色反應的進行乃採美國BRL公司所出品的BluGENE System, 以配合Biotin的標誌系統）。

結果與討論

柑橘黃龍病的病原擬細菌在寄主體內的濃度低且分布不平均，以往須依賴生物檢定法或電顯切片觀察，相當費時且效果不彰。曾嘗試開發單元抗體做爲病害之診斷探針，但因偵測結果不夠穩定而無法有效應用。爲了研製效果穩定且特異性與敏感度高的病原偵測探針，於是應用現代分子生物學技術，進行病原核酸之選殖，製備出核酸探針以供病害診斷及病原檢疫之應用。以質體pBS爲載體，將病原核酸片段載於其上 ，由其形成的836個質體轉殖株（Trans－formants）中找到3個含有病原特異性核酸片段的質體轉殖株，經重覆確認其特異性後，以其中最穩定者來標誌成一個核酸探針。

從台灣全省各地的柑橘園中，採得各類疑似有黃龍病的柑橘植株，其中包括兩株椪柑（Pd1及Pd2 ，採自嘉義埔尾地區）、兩株桶柑（Td1及Td2, 採自新竹峨眉地區）、兩株柳橙（LCd1及LCd2，採自南投地區）、兩株葡萄柚（GFd1及GFd2，採自台東地區），這十個疑似有病的待測樣本，以核酸探針加以偵測，並以實驗溫室內栽植的無毒健康苗之椪柑、桶柑、柳橙、白柚、葡萄柚做爲健康對照組（Ph，Th，LCh，HYh，GFh），偵測的結果如圖 1.所示：所有疑似有黃龍病的植株皆與核酸探針呈正反應，所有的健康的無毒苗則都沒有反應， 由此可看出核酸探針Probe 1是一普遍有效的病原探針，對台灣全省各地不同種類的黃龍病病株皆能做有效之偵測。

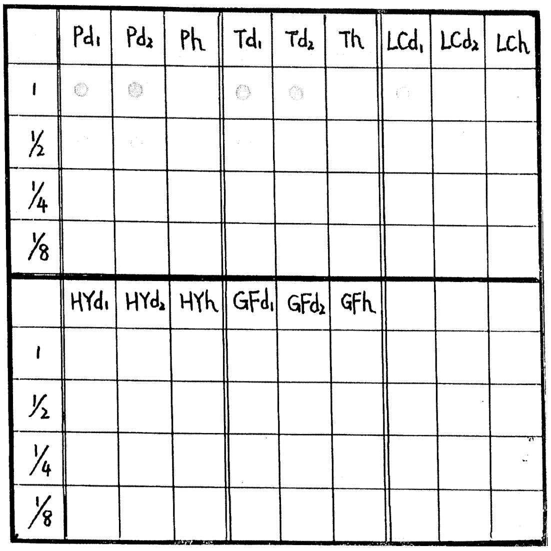


圖 1. 以核酸探針應用點漬雜配法偵測台灣田間各類柑橘之黃龍病。1～1/8表示核酸樣本做1/2濃度系列稀釋，起始濃度爲4ug/ul 。

Fig. 1. Dot hybridization test with GO－DNA probe for detecting Huanlunpin pathogen in citrus samples of various citrus cultivars collected from field in Taiwan.

在一個排水不良，營養不足（尤其是缺乏生理所需的一些微量元素）之柑橘園區，經常可看見柚類植株的葉片產生黃化、彎曲、變硬等生理上的病徵，這些病徵與黃龍病所產生的病徵非常相似，在外表病徵辨識上極易發生混淆，因而可將其稱之爲假性黃龍病。應用黃龍病核酸探針之檢測可以清楚地將假性黃龍病與眞正的黃龍病做確切的分辨。選擇具有類似黃龍病病徵文旦一株（編號WTd－L），白柚兩株（PYd－L1，PYd－L2），和葡萄柚兩株（GFd－L1，GFd－L2），這五株由過去電顯觀察及生物檢定的結果得知它們植株內一直沒有黃龍病病原的跡象，但是它們的葉片卻都產生如黃龍病之病徵。將此五株材料核酸純化以黃龍病核酸探針進行偵測，並用過去已測到有病原的文旦（WTd）、白柚（PYd）、葡萄柚（GFd）各一株做眞正黃龍病之對照，再選擇健康的文旦、白柚、葡萄柚各一株（WTh，PYh，GFh）做健康的對照，整個偵測的結果如圖2.所示：發現五株類似有黃龍病的柚類皆和健康對照組一樣，沒有偵測到黃龍病病原，然而眞正帶有黃龍病的植株則有病原之偵測訊號。由此結果證實這五株柚類產生的病徵是假性黃龍病，並非眞正罹患黃龍病。

此黃龍病病原核酸探針的點漬雜配法［Dot hybridization（DH）］偵測效果穩定且其特異性與敏感度高，只要0.25克以上的材料即可偵測到病原，而1克以上的材料偵測訊號就已相當明顯（圖3），已廣泛應用於病原之偵測及生態之硏究。爲求建立一套簡便且有效的病原偵測法，就採樣方式、材料處理、核酸抽取等加以硏究訂出標準化技術：（1）在同樣的病原核

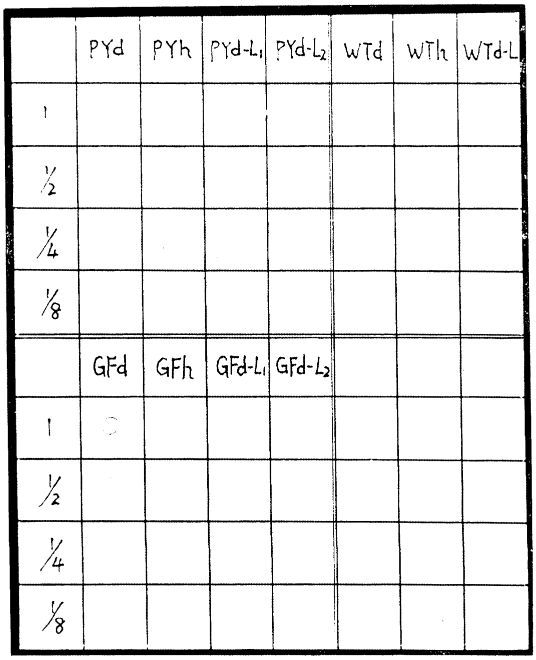


圖2. 以核酸探針應用點漬雜配法辨別眞正黃龍病與生理因子引起之假性黃龍病。1～1/8表示核酸樣本做1/2濃度系列稀釋，起始濃度爲4ug/ul。

Fig. 2. Identification of Huanlungpin－like disease due to physiological factor and Huan－lungpin disease caused by GO by dot hybridization test with DNA probe.

酸純化方法下，中肋部分的偵測效果最好，訊號最強；枝皮部分次之，而整個葉片的偵測效果較差（圖 4）。（2）新鮮的材料經風乾處理使之乾燥，約至失重 50% 後，再抽取其病原核酸來偵測，並與未乾燥處理的同一新鮮材料相互比較其偵測效果及探針敏感度，結果發現經乾燥處理的材料比未乾燥處理者可提高 16 倍偵測敏感度（圖 5）。

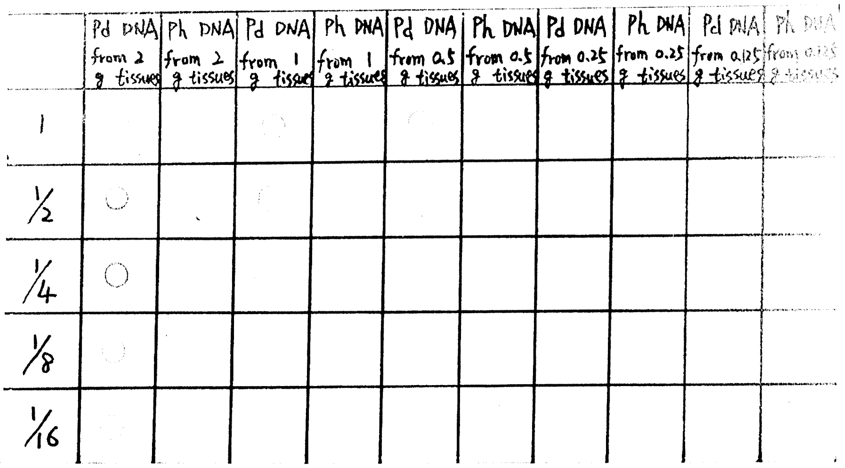
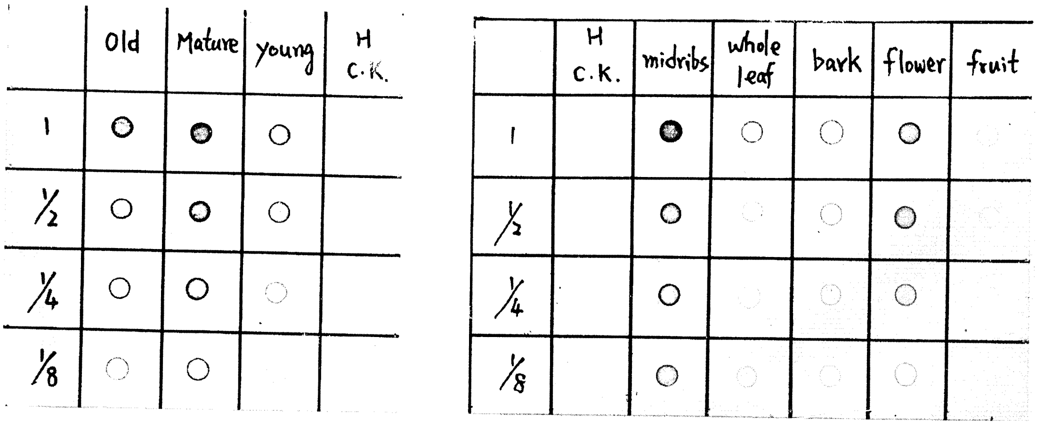


圖 3. 少量材料之點漬雜配偵測。表示核酸探針對少量材料之偵測敏感度。分別 2g、1g、0.5g、0.25g、0.125g 之罹病柑橘（椪柑）材料（Pd）或健康柑橘材料（Ph）中純化核酸，各材料所抽得之核酸皆溶於 6ul 的 6X SSC 溶液後再進行點漬雜配偵測。1～1 / 16 表示核酸樣本做 1 / 2 濃度系列稀釋。

Fig. 3. Dot hybridization showing minimum amount of test tissue for DNA extraction. DNA extracts obtained from 2,1,0.5,0.25, and 0.125 g of diseased (Pd) and heathy (Ph) ponkan tissue respectively.



A　　　　　　　　B

圖 4. 以核酸探針應用點漬雜配法測試黃龍病病原在寄主植株內之分佈。

A. 病原在老葉、成熟葉、幼葉之分佈差異，H 是健康材料對照組。

B. 病原在葉、花、果實等部位之分佈差異，H 是健康材料對照組。

Fig. 4. Distribution of GO within host plant detected by DH test with DNA probe.

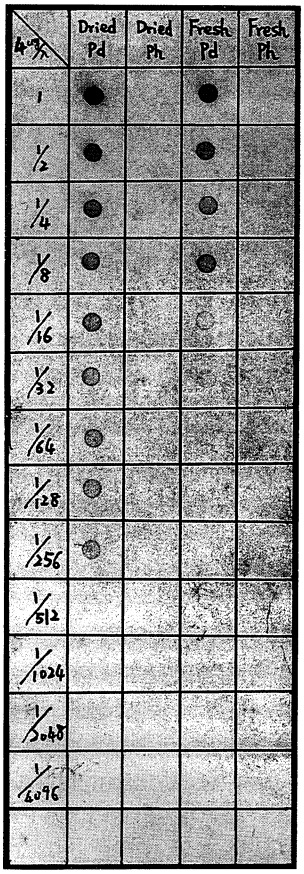


圖 5. 比較乾燥材料與未乾燥材料的點漬雜配偵測之敏感度。

Dried Pd，核酸樣本純化自乾燥的罹病椪柑材料

Dried Ph，核酸樣本純化自乾燥的健康椪柑材料

Fresh Pd，核酸樣本純化自未乾燥的罹病椪柑材料

Fresh Ph，核酸樣本純化自未乾燥的健康椪柑材料

乾燥的材料是將新鮮材料風乾（air－dry）至失重 50%。

1～1 / 4096 表示各核酸樣本做 1 / 2 濃度系列稀釋，起始濃度爲 4ug / ul 。

Fig. 5. Dot hybridization showing improvememt of blotting sensitivitỳ by DNA extracts obtained from dried and freah tissue of Huanlungpin－affected and healthy ponkan plants.

在病原檢疫方面，此核酸探針之特異性除了可檢測台灣各柑橘品種中之黃龍病病原外，亞洲地區部份國家柑橘黃龍病病原亦可與此探針雜配反應（圖 6），但與南非的熱敏感型黃龍病菌系統（Heat－sensitive strains）則不反應（圖 7）。顯示此探針是對亞洲的耐熱型黃龍病菌系統具特異性的核酸探針，亦證明所測試之亞洲各黃龍病菌系統均屬耐熱型系統（Heat－tolerant strains）。

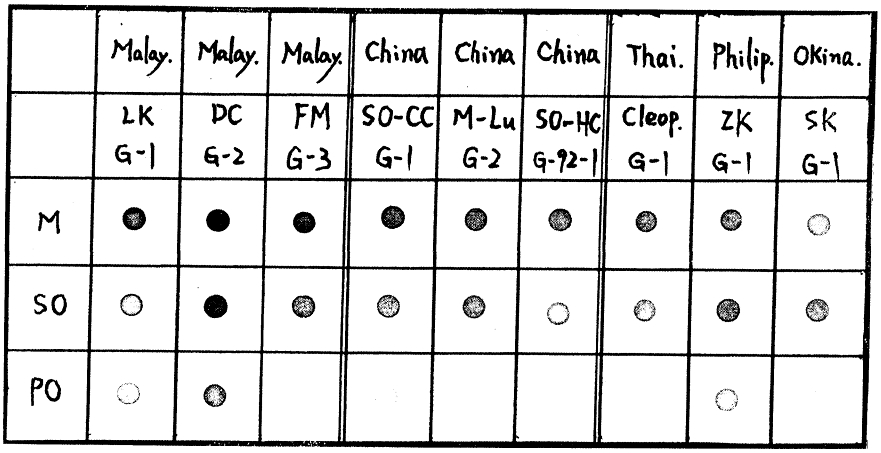


圖6. 以核酸探針應用點漬雜配法鑑別外國黃龍病之病原系統分離株在柑橘品種中之感染增殖情況。將外國黃龍病病原分離株，嫁接感染到三大類柑橘寄主上：寬皮柑類（M）、甜橙類（SO）、柚類（PO），以台灣的黃龍病病原核酸探針偵測到各寄主植株內黃龍病病原的感染增殖情況。各待測植株皆取0.5g之中肋組織進行偵測。

Fig. 6. Infection and multiplication of foreign GO isolate into citrus cultivars detected by dot hybridization with a GO-DNA probe. Tested citrus cultivars: M = Mandarin; SO = Sweet orange; PO = Pumelo.

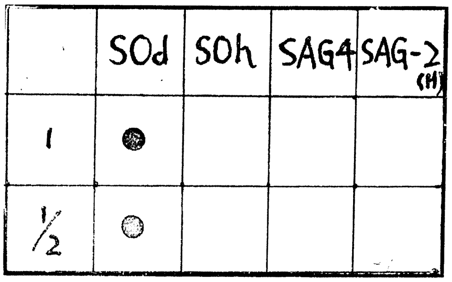


圖7. 以台灣的黃龍病病原核酸探針應用點漬雜配法偵測南非地區之柑橘黃龍病。SOd，台灣罹患黃龍病之甜橙（柳橙）植株，做爲病對照組；

SOh，台灣健康的甜橙植株，做爲健康對照組；

SAG2,4，具典型黃龍病病徵的 Valencia 甜橙二株，採自南非地區。

1～1/2 表示核酸樣本做1/2濃度系列稀釋，起始濃度爲4ug/ul。

Fig. 7. Dot hybridization test with DNA probe for confirming the DNA homology between Taiwan (Asian) greening organism and African greening organism in Valencia samples collected from South Africa.

參考文獻

1. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current Protocol in Molecular Biology. Published by Greene Publishing Associates and Wiley - Interscience, U.S.A.
2. Chen, M. H., T. Miyakawa, and C. Matsui. 1971. Mycoplasma - like bodies associated with likubin - diseased Ponkan citrus. Phytopathology 61 (5):598.
3. Chen, M. H., T. Miyakawa, and C. Matsui. 1972. Simultaneou infections of citrus leaves with tristeza virus and mycoplasma - like organism. Phytopathology 62:663 - 666.
4. David, R. E., I. M. Lee, W. Sinclair, and S. M. Douglas. 1988. Biotinylated cloned DNA probe detects ash yellows mycoplasmalike organism in ash. Phytopathology 78: 1555. (Abstr.)
5. Huang, A. L., and H. J. Su. 1987. Electronmicroscopical Studies on the Morphology and Population Dynamic of Fastidious Bacteria Causing Citrus Likubin. Ph.D. thesis published by National Taiwan University , Taiwan.
6. Huang, C. H., M. J. Chen, and R. J. Chiu. 1980. Separation of a mycoplasmalike organism form the likubin complex in citrus. Plant Dis. 64 (6):564 - 566.
7. Korsten, L.,G. M. Sanders, H.J. Su, M.Garneir, and J. M.Bove. 1992. Detection of citrus greening - infected citrus in South Africa by immunofluorescence and enzyme - linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies and DNA probes. Proc. 12th Intern. Conf. Citrus Virologists .
8. Lee, I. M., and R. E. Davis. 1983. Phloem - limited prokaryotes in sieve elements isolated by enzyme treatment of disease plant tissues. Phytopathology 73: 1540 - 1543.
9. Lee, I. M., R. E. Davis, W. A. Sinclair, N. D. DeWitt, and M. Conti. 1993. Genetic relatedness of mycoplasmalike organisms detected in Ulmus spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. Phytopathology 83: 829 - 833.
10. Lin, C. P., and T. A. Chen. 1985. Monoclonal antibodies against the aster yellows agent. Science 227: 1233 - 1235.
11. Matsumoto, T., and H. J. Su. 1966. Likubin or huanglungpin, citrus virus disease closely related to tristeza (I). J. Agr. Assoc. China New Ser. 56: 1 - 12.
12. Matsumoto, T., M. C. Wang, and H. J. Su. 1961. Studies on likubin, p.121 - 125. *In:* Proceeding of the Second Conference of the International Organization of Citrus Virologists. (W. C. Price, ed.), University of Florida, Gainesville. Calavan, ed., University of California, Riverside.
13. Starr, M. P., and J. M. Schmidt. 1981. Procaryote diversity, p.3 - 42. *In:* The Procaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. (M. P. Starr,

H.O. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegelveds.)

14. Su, H. J., and S. C. Leu. 1972. Study on the pathogen complex causing likubin of citrus in Taiwan. I. Nature of mycoplasma - like organism associated with the disease. Proc. Natl. Sci. Council. 5: 109 - 126.

15. Su, H.J., T.H. Hung, and M.C.Tsai. 1991. Recent developments on detection of citrus greening disease. Proc. 6th Inter. Asia Pacific Workshop on 'Integrated citrus health management', Kuala Lumpur, Malaysia, p. 24 - 30.

16. Su, H. J., T. H. Hung, and M.C. Tsai. 1992. Detection of the fastidious bacteria caus - ing the Asian citrus greening by DNA probes. Proc. 12th Inter. Conf. Citrus Virologits.

Preparation and Application of Diagnostic DNA Probe on the Fastidious Bacteria Causing Citrus Huanlunpin (Greening)

Hong-Ji Su, Ting-Hsuan Hong and Meng-Ling Wu
Department of Plant Pathology and Entomology,
National Taiwan University

Summary

The fastidious bacteria causing citrus Huanlungpin, called Likubin (greening) inhabit in sieve tubes of host plants unevenly in low population. In order to prepare highly sensitive and specific diagnostic probes, an attempt was made to prepare nucleic acid probes for disease diagnosis and pathogen detection. Through cloning genomic DNA of the pathogen into plasmid pBS as vector, one stable transformant was selected to prepare biotine-labled DNA probes. Dot hybridization(DH) with the selected DNA probe 1 showed specific and sensitive reaction constantly with DNA extract from greening-affected citrus plants. DH with DNA probe 1 has been commonly applied to detection and ecological study of the pathogen. Detection of pathogen in symptomless citrus plants could be accomplished by the techniques with DNA probes so far developed, which were applied the indexing citrus foundation stocks and seedlings, and epidemiological study. As for the specificity in pathogen identification, the DNA probe could be used for identifying Huanlunpin pathogen in the all citrus cultivars of Taiwan, and also showed strong specific reaction in DH test with GO in citrus samples collected from the Asian countries. However, this DNA probe did not reacted with the heat-sensitive strain of African greening from South Africa. It implied that the DNA probe was just specific to Asian heat-tolerant strain of greening pathogen, and the all test GO isolates from the Asian countries were belonging to the heat-tolerant strain.

Key words: Citrus greening, Dot hybridization, DNA probe.